



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/30, 1/21, C12P 21/02 C07K 13/00, C12N 15/62 G01N 33/566, A61K 39/002 C12N 5/10	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/25689 (43) Date de publication internationale: 23 décembre 1993 (23.12.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00575 (22) Date de dépôt international: 15 juin 1993 (15.06.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/07206 15 juin 1992 (15.06.92) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). INSTITUT PASTEUR DE LILLE [FR/FR]; 1, rue du Professeur A.-Calmette, B.P. 245, F-59019 Lille Cédex (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).		(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : CESBRON, Marie-France [BE/FR]; 2, avenue Barrois, F-59700 Marcq-en-Baroeul (FR). MERCIER, Corinne [FR/FR]; 49, rue Croix-de-Glageon, F-59177 Sains-du-Nord (FR). CAPRON, André [FR/FR]; 58, rue du Capitaine-Jasmin, F-59133 Phalempin (FR). TARTAR, André [FR/FR]; Rue du Moulin, F-62490 Vitry-en-Artois (FR). MAES, Pierrette [FR/FR]; 11, avenue du Roi-Albert-1er, F-59290 Wasquehal (FR). (74) Mandataires: ORES, Irène etc. ; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: CLONING OF GENE ENCODING THE GP28.5 PROTEIN OF TOXOPLASMA GONDII; PEPTIDE FRAGMENTS OF SAID PROTEIN AND THEIR APPLICATIONS (54) Titre: CLONAGE DU GÈNE CODANT POUR LA PROTEINE GP28.5 DE T. GONDII; FRAGMENTS PEPTIDIQUES ISSUS DE LADITE PROTEINE ET LEURS APPLICATIONS (57) Abstract The invention relates to cloning of the gene coding for the toxoplasma GP28.5 antigen. It also encompasses purified GP28.5 antigen preparations and antigenic polypeptides derived from said antigen, and their applications. (57) Abrégé L'invention est relative au clonage du gène codant pour l'antigène GP28.5 de toxoplasme. L'invention englobe également des préparations antigéniques purifiées de l'antigène GP28.5, ainsi que des polypeptides antigéniques dérivés de cet antigène, et leurs applications.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

CLONAGE DU GENE CODANT POUR LA PROTEINE GP28.5 DE T. GONDII ; FRAGMENTS PEPTIDIQUES ISSUS DE LADITE PROTEINE ET LEURS APPLICATIONS.

La présente Invention est relative au clonage
5 du gène codant pour un antigène d'excrétion-sécrétion de 28,5 kDa de toxoplasme, et à l'obtention de fragments peptidiques représentant des épitopes de celui-ci, ainsi qu'à des préparations dudit antigène et de ses fragments, et à leurs utilisations.

10 La toxoplasmose est une des infections à protozoaires les plus répandues, aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Elle est responsable d'environ 25% des décès chez les patients atteints du SIDA. L'infection congénitale, cause d'avortements ou de malformations néo-
15 natales sévères chez l'homme et les animaux domestiques, pourrait être prévenue. En effet, on sait que la primo-infection induit une immunité de longue durée.

Dans la recherche d'antigènes protecteurs permettant le développement d'un vaccin contre la toxo-
20 plasmose, différents antigènes ont été étudiés. L'équipe des Inventeurs s'est en particulier intéressée aux antigènes d'excrétion-sécrétion (ESA) des tachyzoïtes. Il a en effet été établi, au cours d'expérimentations aussi bien chez l'homme que chez l'animal, que les antigènes
25 ESA étaient immunogènes. Il a également été montré que certains des ESA possèdent des épitopes communs avec des antigènes des bradyzoïtes. Or, les bradyzoïtes sont la forme résistante du parasite.

Différentes approches, comprenant en particu-
30 lier la production d'anticorps monoclonaux, le marquage à l'or colloïdal, et la biologie moléculaire, ont conduit l'équipe des Inventeurs à la caractérisation de quatre antigènes communs [CHARIF et al. Exp. Parasitol., 71:117 (1990)], [CESBRON-DELAUW et al., Proc. Natl. Acad. Sci.
35 USA, 86:7537 (1989)], [DARCY et al., Parasitol. Res. 76:478, (1990)]. Le principal, dénommé Gra2 ou GP28.5, est une glycoprotéine de 28.5 kDa, et il a été montré qu'il

était un constituant de la matrice des granules denses des tachyzoïtes, et qu'il était associé avec le réseau de micro-villosités de la vacuole parasitophore du parasite, après invasion de l'hôte .

5 Un antigène de 28 kDa (P28), considéré comme similaire à l'antigène GP28.5, a été décrit par SIBLEY et SHARMA [SIBLEY et al. Infect. Immun. 55:2137 (1987)], et une séquence d'ADN codant pour cet antigène a été publiée par PRINCE et al. [Molec. Biochem. Parasitol. 34:3
10 (1989)].

La présente Invention s'est fixé pour but l'obtention de préparations purifiées de l'antigène GP28.5, ainsi que l'obtention de cet antigène sous forme recombinante, et sa caractérisation immunologique. En
15 particulier, la présente Invention a pour but la localisation et la caractérisation d'épitopes spécifiques de l'antigène GP28.5.

Les Inventeurs sont parvenus à obtenir une préparation purifiée de l'antigène GP28.5, et ont
20 démontré l'effet protecteur d'une immunisation par cette préparation contre l'infection par *Toxoplasma gondii* chez la souris.

Les Inventeurs ont également cloné l'ensemble du gène codant pour l'antigène GP28.5, et ont localisé
25 les introns et les exons, ainsi que les régions non-codantes en 5' et 3'.

La présente invention a pour objet un fragment d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence codant pour l'antigène GP28.5 de toxoplasme. Un
30 fragment d'acide nucléique conforme à l'Invention est représenté dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ.ID.NO:1. Par : "séquence codant pour l'antigène GP28.5 de toxoplasme", on entend non seulement la séquence codante identifiée dans la séquence
35 SEQ.ID.NO:1, mais également toute séquence qui, compte tenu de la dégénérescence du code génétique, code pour le

polypeptide représenté dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ.ID.NO:2.

Les Inventeurs ont également montré que l'antigène GP28.5 contient plusieurs épitopes majeurs
5 spécifiques des cellules B ; l'un d'entre eux, qui est reconnu par un anticorps monoclonal de souris dénommé TG17-179 [CHARIF et al., Exp. Parasitol., 71:117 (1990)] est localisé à l'extrémité C-terminale de la molécule.

Les Inventeurs ont caractérisé cet épitope et
10 ont montré qu'il comprenait au moins les 5 acides aminés C-terminaux de GP 28.5. En outre, ils ont montré que cet épitope est également un épitope majeur reconnu par des anticorps polyclonaux humains dirigés contre *T. gondii*.

L'Invention englobe également des fragments
15 d'acide nucléique qui codent pour des polypeptides représentant des épitopes de l'antigène GP28.5.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente Invention, ledit fragment d'acide nucléique code pour un polypeptide comprenant au moins les 5 acides
20 aminés C-terminaux de la séquence SEQ.ID.NO:2.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, ledit fragment d'acide nucléique code pour un polypeptide comprenant le fragment 24-129 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

25 Selon encore un autre mode de réalisation préféré de l'invention, ledit fragment d'acide nucléique code pour un polypeptide comprenant le fragment 127-176 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

L'Invention a également pour objet des vec-
30 teurs recombinants (plasmides, virus, etc...) caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un fragment d'acide nucléique tel que défini ci-dessus, codant pour l'antigène GP28.5 de toxoplasme, ou pour un fragment peptidique représentant un épitope de celui-ci.

35 Lesdits vecteurs sont en particulier des vecteurs d'expression, comprenant des séquences de type

promoteur, terminateur, etc...

La présente Invention a également pour objet des cellules eucaryotes ou procaryotes transformées (et en particulier des microorganismes), caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins un vecteur recombinant conforme à l'Invention.

L'Invention a également pour objet un polypeptide de 185 acides aminés dont la séquence qui est représentée à la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ.ID.NO:2, est celle de l'antigène GP28.5 de toxoplasme.

L'Invention englobe également les polypeptides dont la séquence ne diffère de la séquence mentionnée ci-dessus que par quelques acides aminés, en particulier des polypeptides représentant des variants alléliques ou des isoformes de l'antigène GP28.5.

L'Invention comprend également des protéines recombinantes comprenant tout ou partie de la séquence de la séquence SEQ.ID.NO:2, éventuellement fusionnée avec une autre séquence polypeptidique ; dans ce cadre, l'Invention a en particulier pour objet :

- une protéine recombinante de 212 acides aminés, comprenant la totalité de la séquence de l'antigène GP28.5 ;
- une protéine recombinante comprenant les amino-acides 127-176 de la séquence SEQ.ID.NO:2 ;
- une protéine recombinante comprenant les amino-acides 1-129 de la séquence SEQ.ID.NO:2 ;
- une protéine recombinante comprenant les aminoacides 24-129 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

L'Invention concerne également un procédé de production d'une protéine recombinante telle que définie ci-dessus, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle l'on procède à la mise en culture de cellules transformées telles que définies plus haut, comprenant au moins un fragment d'ADN

conforme à l'Invention.

Les polypeptides recombinants conformes à l'Invention, exprimés chez E. coli, conservent des épitopes majeurs impliqués dans la réponse polyclonale à l'antigène GP28.5, et ce, bien que l'expression chez E. coli ne maintienne pas l'intégrité structurale de la protéine GP28.5 qui est une protéine glycosylée.

Si l'on souhaite toutefois obtenir d'autres épitopes tels que des épitopes de nature glucidique, ou des épitopes correspondant à des structures tertiaires et quaternaires, on choisira de produire la GP28.5 recombinante dans des systèmes eucaryotes tels que par exemple, les levures ou les baculovirus.

Les Inventeurs ont en outre montré que la séquence C-terminale de quinze acides aminés de l'antigène GP28.5 représente un épitope reconnu par un certain nombre de sérums de patients atteints d'infections aiguës ou chroniques, et ont également localisé d'autres épitopes B majeurs dans le fragment correspondant aux amino-acides 127-176 de la séquence SEQ.ID.NO:2. En outre, les Inventeurs ont localisé d'autres régions comprises entre les acides aminés 24 et 129, et en particulier les régions correspondant aux acides aminés 55-70 et aux acides aminés 140-160 de la séquence SEQ.ID.NO:2, qui comprennent des épitopes de l'antigène GP 28.5 reconnus par les sérums humains.

L'Invention a également pour objet des peptides comprenant au moins un épitope de l'antigène GP28.5.

Selon un mode de réalisation préféré de l'Invention, ledit peptide comprend les 5 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ.ID.NO:2

Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, ledit peptide comprend entre 5 et 15 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ.ID.NO:2.

Selon une modalité préférée de cette disposition, ledit peptide comprend les 8 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ.ID.NO:2.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'Invention, ledit peptide comprend les acides aminés 24-129 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'Invention, ledit peptide comprend les acides aminés 55 à 70 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

Selon encore un autre mode de réalisation préféré de l'Invention, ledit peptide comprend les acides aminés 140 à 160 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

La séquence des 5 acides aminés C-terminaux de l'antigène GP28.5 est reconnue en immuntransfert par l'anticorps monoclonal de souris TG 17-179. Un ELISA compétitif avec des peptides plus longs a montré que l'immunoréactivité était conservée pour des peptides de 8 résidus ou plus, et perdue quand le peptide était réduit aux 6 derniers résidus C-terminaux ou moins. Des expériences avec l'octapeptide dépourvu du résidu glutamine C-terminal ont montré qu'il était alors 20 fois moins actif. En revanche, ni l'addition de résidus à l'extrémité C-terminale, ni la substitution de la fonction COOH terminale ne changent l'immunoréactivité de l'épitope. En outre, des expériences de compétition entre l'anticorps monoclonal TG 17-179 et des sérums de patients infectés ont montré que l'épitope défini par cet anticorps monoclonal est également un épitope majeur pour les anticorps polyclonaux humains.

L'Invention a également pour objet des compositions antigéniques caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un antigène pris dans le groupe constitué par :

- une préparation purifiée de l'antigène GP28.5 ;
- un polypeptide de séquence SEQ.ID.NO:2 ;

- un fragment dudit polypeptide représentant un épitope de l'antigène GP28.5 ;

- une protéine recombinante comprenant tout ou partie de la séquence SEQ.ID.NO:2.

5 L'Invention englobe également un procédé de préparation d'anticorps anti-GP28.5, polyclonaux ou monoclonaux, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on immunise un animal avec une composition antigénique conforme à l'Invention.

10 Les compositions antigéniques conformes à l'Invention permettent également la préparation de réactifs de diagnostic, ou de vaccins anti-toxoplasmes. L'Invention englobe également ces réactifs et ces vaccins.

15 La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples concernant le clonage du gène codant pour l'antigène GP28.5 de *Toxoplasma gondii*, et l'identification des épitopes spécifiques de cet
20 antigène.

I) CLONAGE ET EXPRESSION DU GENE CODANT POUR LA GP28.5 DE *T. gondii*

Sauf précision contraire, les techniques de manipulation des acides nucléiques et de clonage moléculaire utilisées dans les exemples qui suivent sont celles
25 décrites par SAMBROOK et al. [A Laboratory Manual (second edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. (1989)]

L'anticorps TG 17-179 a été obtenu à partir de
30 souris BALB/C immunisées avec des antigènes ESAs comme décrit par CHARIF et al. [Exp. Parasitol. 71:114 (1990)].

EXEMPLE 1 : CLONAGE DU GENE CODANT POUR LA GP28.5 de *T. gondii*

1°) Obtention des toxoplasmes.

35 Des tachyzoïtes ont été obtenus à partir du fluide péritonéal de souris infectées trois jours aupara-

vant avec la souche RH de *Toxoplasma gondii*. Les parasites ont été récoltés dans du milieu RPMI 1640 (GIBCO BRL), filtrés à travers des membranes de polycarbonate (diamètre de pores 3 microns) (NUCLEPORE.) et lavés deux
5 fois dans le même milieu.

2*) Préparation d'acide nucléique de *Toxoplasma gondii*. L'ARN total a été isolé de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* de la souche RH par extraction au lithium/urée, et l'ARN poly (A+) a été purifié par
10 passage sur une colonne d'oligo (DT)-cellulose.

3*) Construction de la banque d'ADNc de tachyzoïtes.

a) Construction dans λ gt11

La construction de la banque d'ADNc de toxoplasme dans le phage lambda gt11 a été décrite par
15 CESBRON-DELAUW et al. [CESBRON-DELAUW et al. Proc. Natl. acad. Sci. USA, 86:7537 (1989)]. La banque, après amplification, a été étalée sur des cellules de *E. coli* Y1090 et criblée en utilisant l'anticorps monoclonal TG 17-179.
20 Les clones positifs ont été détectés par incubation avec des anticorps anti IgG de souris conjugués à la peroxydase, suivis d'un marquage au 4-chloro-1 naphthol.

Trois clones de λ gt11 ont été sélectionnés : il s'agit des clones FM3, FM1, et FM16, contenant respectivement des inserts de 450, 550, et 650 paires de base.
25 Des fragments de restriction EcoRI de ces clones ont été sous-clonés dans les vecteurs M13, mp18, et mp19, et séquencés par la méthode de SANGER [FEINBERG et al. Anal. Biochem. 137:266 (1984)].

30 Le séquençage a montré que ces trois clones codent tous pour l'extrémité C-terminale de GP28.5.

b) Construction dans λ ZapII

La banque d'ADNc de tachyzoïtes a été construite dans le vecteur λ ZapII, en utilisant le "ZAP
35 cDNA SYNTHESIS KIT" (STRATAGENE). L'ADNc a été synthétisé en utilisant comme matrice 5 μ g d'ARN poly-A des tachy-

zoïtes, à l'aide de la transcriptase inverse (MMLVRT) pour la synthèse du premier brin, et de l'ADN polymérase I et la RNase H pour la synthèse du second brin. Après ligature en 3' d'un adaptateur EcoRI, et après digestion
5 en 5' par XhoI, l'excès d'adaptateur a été éliminé par chromatographie sur acrylamide-agarose (Ac-A 34, IBF). Les ADNc ont ensuite été ligaturés dans le gène LacZ de λZapII ("UNI ZAP XR", STRATAGENE) et encapsidés in vitro ("GIGAPAC II GOLD PACKAGING EXTRACT", STRATAGENE). Avant
10 amplification, la librairie comprend 10^6 phages recombinants.

Après amplification, les phages ont été étalés sur E. coli XLI-Blue et la banque a été criblée avec d'une part, le sérum polyclonal de souris dirigé contre
15 l'antigène GP28.5 purifié (dilution au 1/100) et, d'autre part, l'anticorps monoclonal TG17-179 (dilution au 1/500), tous deux dilués dans du tampon TBS (10 mM TRIS HCl pH 8, 15mM NaCl). La co-infection des bactéries par λZapII et un phage auxiliaire (R408, Stratagène) a per-
20 mis d'exciser le phagemide pBluescript contenant les inserts d'ADNc clonés. L'ADN simple brin obtenu à partir du phagemide en présence du même phage auxiliaire a été directement employé pour séquencer les inserts d'ADNc par la méthode des di-déoxynucléotides.

25 Le criblage de la banque d'ADNc construite dans le vecteur d'expression λZapII a permis l'obtention d'ADNc plus longs. Le plus long de ceux-ci, dénommé "LcDNA" comprend 1100 pb ; sa séquence en 3' est homologue à celle de la P28 de PRINCE et al., mais est plus
30 courte d'au moins 121 bp en 5'.

4') Construction d'une banque génomique de *Toxoplasma gondii* dans le phage EMBL 3 :
Après digestion partielle de l'ADN génomique des tachyzoïtes avec MboI, la banque génomique a été construite
35 comme décrit par CESBRON-DELAUW et al. [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:7537 (1989)].

La banque construite dans le phage EMBL3 a été étalée sur E. coli P2392, et criblée à l'aide d'un fragment de restriction de l'ADNc (fragment EcoRI-SalI de 195 pb), utilisé comme sonde, après marquage préalable au ^{32}P . Les hybridations ont été effectuées à 65 °C, dans du tampon 5X DENHARDT [le tampon 50X DENHARDT contient 1% de SAB, 1% de PVP, 1% de Ficoll (w/v)] et 6,6X SSC (10X SSC comprend 3M NaCl, 0,3M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 2 H_2O , pH 7,2).

Un clone génomique dénommé Gra2-EMBL3 a été sélectionné ; à partir de ce clone, un fragment de 2040 pb, comprenant l'ensemble du gène ainsi que 780 pb de séquence flanquante 5' et 32 pb de séquence flanquante 3', a été sous-cloné.

La figure 1 représente la carte de restriction partielle sur 5 kb du clone génomique Gra2-EMBL3, ainsi que la carte de restriction partielle d'une région de 2040 pb de celui-ci, qui comprend la totalité du gène GP28.5. Cette figure montre également la région transcrite et la région codant pour la protéine GP28.5.

L'analyse en Southern blot d'ADN génomique de tachyzoïte hybridé avec une sonde d'ADNc de 1100 pb (clone LcDNA) confirme cette carte de restriction. Elle indique également que le gène codant pour GP28.5 n'est probablement pas répété dans le génome des toxoplasmes.

La ligne du haut est une carte de restriction partielle du clone génomique Gra2-EMBL3 contenant le gène GP28.5 (ce gène est indiqué par une boîte). Le reste de la figure est un agrandissement d'une région de 2040 pb qui représente un sous-clone du clone génomique GP28.5, et qui contient le gène codant pour GP28.5 ainsi que les séquences flanquantes de 780 pb en 5' et de 32 pb en 3'. Le cadre ouvert de lecture de GP28.5 est indiqué. Le fragment EcoRI-SalI de 195 paires de base qui a été utilisé comme sonde pour le criblage des banques est indiqué sous les cartes de restriction ainsi que les clones de cDNA: LcDNA, FM16, FMI, FM3. La séquence AAAA indique la

queue poly-A des transcrits. Les régions codantes sont hachurées. Les sites de restriction sont indiqués par les abréviations suivantes : AI = AccI, AII = AvaII ; B = BglI ; E = EcoRV ; H = HindIII ; N = NaeI ; ND = NdeI ;
5 PI = PstI ; PII = PvuII ; S = SalI ; SM = SmaI.

La séquence complète du gène GP28.5 et des régions 5' et 3' non codantes est montrée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ.ID.NO:1. Pour déterminer l'organisation du gène GP28.5, la séquence de
10 la banque génomique a été comparée avec la séquence du clone LcDNA.

Cette comparaison montre que le gène GP28.5 est constitué de deux exons (exon 5':251 pb ; exon 3':800 pb) séparés par un intron de 239 pb.

15 Un codon ATG initiateur de traduction est présent à la position 886, et le cadre ouvert de lecture se termine à la position 1682 avec un codon TAA. Ce cadre ouvert de lecture code potentiellement pour une protéine de 185 acides aminés dont le poids moléculaire théorique
20 est de 19,8 KDa. Un site potentiel de clivage d'une séquence signal est situé entre les alanines 23 et 24. Le cadre ouvert de lecture est bordé en 3' par une séquence non codante de 32 pb. Un transfert de Northern réalisé sur l'ARN total de tachyzoïtes révèle une seule popula-
25 tion d'ARNm codant pour la protéine GP28.5. La taille du messenger est estimée approximativement à 1100 pb, ce qui correspond à la taille du clone LcDNA.

Pour définir plus précisément le site d'initiation de la transcription, une extension d'amorces a
30 été effectuée avec l'ARN total de tachyzoïtes, en utilisant comme amorce un oligo-nucléotide (CM10), correspondant aux positions 888 à 867 de la séquence. Par cette méthode, trois sites potentiels différents d'initiation de la transcription ont été localisés,
35 respectivement à 105, 103 et 102 pb en amont du signal d'initiation de la traduction. Les deux premiers peuvent

correspondre à des sites de transcription mineurs alors que le troisième est sans doute le site majeur d'initiation de la transcription.

La séquence d'acides aminés de GP28.5 est plus courte de 67 acides aminés à son extrémité N-terminale que la séquence supposée de l'antigène P28 précédemment publiée par PRINCE et al. Pour vérifier le fait que la séquence SEQ.ID.NO:1 est bien celle qui code pour l'antigène GP28.5, la séquence en acides aminés correspondante a été comparée à celle de cinq peptides résultants du clivage par la trypsine de l'antigène GP28.5 purifié par HPLC comme décrit ci-dessous. La séquence de ces cinq peptides a été entièrement retrouvée dans la séquence en acides aminés déduite de celle du cadre ouvert de lecture du gène cloné.

EXEMPLE 2 : PREPARATION DE PROTEINES RECOMBINANTES
COMPRENANT DES FRAGMENTS DE LA SEQUENCE DE GP28.5 :

1) Protéines de fusion avec la Glutathion-S-Transférase

- Deux clones d'ADNc représentant des fragments de la séquence codent pour la protéine GP28.5 ont été sous-clonés dans le plasmide pGEX-2T [SMITH et al. Gene, 67, 31-40 (1988)]. Le premier clone, FM16, code pour les cinquante-neuf acides aminés C-terminaux de GP28.5, et le deuxième clone, L représente 212 acides aminés de GP28.5.

5 autres fragments (figure 3) codant pour des portions de la protéine GP28.5 ont également été sous-clonés dans les plasmides pGEX-2T et pGEX-3X (SMITH et al., cité) :

- le premier clone, ptg.Gra2.1, dérivé du clone LcDNA, code pour 212 acides aminés dont les 185 de GP28.5 ;

- le second clone, ptg.Gra2.2, dérivé du clone cDNA FM16, code pour les 59 acides aminés C-terminaux de la protéine GP28.5 ;

- le troisième clone, ptg.Gra2.3, code pour 50 acides aminés (acide aminé 127 à acide aminé 176 inclus, voir figure 3) ;

- le quatrième clone, ptg.Gra2.4, code pour 5 186 acides aminés ;

- le cinquième clone, ptg.Gra2.5, code pour 129 acides aminés (partie N-terminale de la protéine GP28.5, jusqu'à l'acide aminé 129 inclus) ;

- le sixième clone, ptg.Gra2.6, code pour 171 10 acides aminés (à partir de l'acide aminé 15 inclus) ;

- le septième clone, ptg.Gra2.7, code pour 155 acides aminés (à partir de l'acide aminé 31 inclus).

Les plasmides pGEX-2T et pGEX-3X contenant les inserts d'ADN ont été utilisés pour transformer des 15 bactéries E. coli JM 109. L'expression et la purification des protéines recombinantes ainsi que de la GST seule ont été effectuées selon le protocole décrit par SMITH et JOHNSON (référence précitée). Une culture de E. coli JM 109 au milieu de la phase logarithmique a été stimulée 20 par 0,1 mM de IPTG. Après 1 heure de croissance à 37°, les cellules sont refroidies sur la glace et centrifugées à 4000 rpm pendant 15 minutes. Le culot est re-suspendu dans 0,02 M PBS, 0,5 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1% TRITON X 100. Les cellules sont soniquées sur la glace et centrifugées 25 à 10 000 g pendant 5 minutes. Les protéines recombinantes sont purifiées à partir du surnageant, par chromatographie d'affinité sur de l'agarose-glutathion. L'expression des protéines recombinantes a été contrôlée par immuno-transfert en utilisant l'anticorps monoclonal TG17-179 ou 30 le sérum polyclonal de souris dirigé contre l'antigène GP28.5 purifié. Les protéines recombinantes correspondant aux clones ptg.Gra2.2 (59 acides aminés) et ptg.Gra2.3 (50 acides aminés) ont été purifiées avec un rendement élevé. En revanche, les protéines recombinantes corres- 35 pondant aux clones ptg.Gra2.1 (212 acides aminés), ptg.Gra2.4 (186 acides aminés) et ptg.Gra2.5 (129 acides

aminés) n'ont été obtenus qu'avec des rendements faibles qui semblent dûs à la dégradation des protéines d'une part, et d'autre part à la présence de la séquence signal (les 23 premiers acides aminés de la protéine GP28.5) dans les protéines recombinantes.

2) Protéines de fusion avec la β -galactosidase

Des phages lysogènes recombinants ont été produits à partir du clone original de λ gt11 FM16, chez *E. coli* Y1089, selon le procédé décrit par HUYNH et al. [Glover, D.M. ed. vol. 1, 49-78 IRL Press, Oxford (1985)]. Des lysats bruts contenant la β -galactosidase de type sauvage ou bien la protéine de fusion [GP 28.5/ β -galactosidase] ont été préparés par induction de cultures en phase logarithmique, par chauffage à 45°C pendant 20 minutes et addition de isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside à une concentration de 10 mM. Après une incubation supplémentaire à 37°C pendant 1 heure, la culture a été concentrée, dans un tampon 0,01 M Tris, pH8, 0,1 M EDTA, 10 mM NaCl, puis lysée par addition de 0,25 mg de lysozyme, 0,01 M $MgCl_2$, et 0,2% TRITON X100, et enfin traitée par la DNaseI à 37°C pendant 30 minutes.

Les clones FM1 et FM16 réagissent beaucoup plus fortement avec l'anticorps TG 17-179 que le clone FM3. La carte de restriction montre que les inserts EcoRI de 450 pb (FM3), 550 pb (FM1) et 650 pb (FM16) contiennent des séquences qui se chevauchent.

Le séquençage de ces clones a révélé que les cadres de lecture en phase avec celui de la β -galactosidase étaient de seulement 17 pb pour FM3, et 95 pb et 172 pb pour FM1 et FM16 respectivement, le reste des inserts correspondant à la région 3' non traduite plus la queue polyA. Il apparaît donc que le peptide correspondant aux 5 amino acides C-terminaux de l'antigène GP28.5 codé par le clone FM3, est suffisant pour obtenir une réaction antigénique.

II) PURIFICATION DE L'ANTIGENE GP28.5EXEMPLE 3 : PURIFICATION DE L'ANTIGENE GP28.5 PAR HPLC.

- 10¹⁰ tachyzoïtes de la souche RH ont été lavés deux fois avec 10 mM PBS, pH 7,2. Après centrifugation à 5 1000 g pendant 10 minutes, le culot a été incubé toute la nuit à 4°C sous agitation douce, à une concentration de 10⁹ parasites/ml dans du tampon TEN (10 mM TRIS-HCL, pH 7,4 ; 2 mM EDTA ; 150 mM NaCl) additionné de 1% de NONIDET P40, de 100 U/ml d'aprotinine et de 40 µM de PMSF.
- 10 Après centrifugation à 3500 g pendant 20 minutes, le surnageant a été récupéré et filtré sur une membrane MILLIPORE de 0,22 µm. Les protéines de tachyzoïtes extraites au NP40 ont été purifiées par chromatographie HPLC en phase inverse sur une colonne VYDAC C18 (300 Å, 15 taille des particules : 7 µm, dimensions de la colonne : 500x9mm). 8 ml d'extrait de protéines brutes ont été chargés sur la colonne C18 à 0% de solvant B [le solvant A est constitué de 0,5% v/v de TFA dans l'eau ; Le solvant B est un mélange 25/75/0,45 (v/v) d'eau/acétonitrile/TFA].
- 20 Après 10 minutes d'élution isocratique, les protéines sont éluées avec un gradient de 0 à 100% de solvant B, pendant une durée de 180 minutes, à une vitesse d'élution de 2 ml par minute, et détectées à 215 nanomètres. Pour localiser l'antigène GP28.5, chaque 25 fraction HPLC a été lyophilisée, et le lyophilisat a été dilué dans 100 µl d'un mélange TEN/PBS, [10 mM, pH 8 (v/v)]. 1 µl de chaque fraction a été testé par dot-blot en utilisant l'anticorps monoclonal TG17-179. 10 µl (ce qui correspond à environ 12 µg de protéine purifiée) de 30 chacune des fractions qui ont montré une réaction positive, ont été déposés sur gel d'acrylamide en présence de 2-ME, Une coloration du gel au nitrate d'argent a permis de vérifier leur homogénéité et leur pureté. Un gel similaire a été réalisé et utilisé pour le transfert électrophorétique sur membrane de nitro-cellulose. L'antigénicité des fractions a été évaluée en incubant la membrane 35

avec l'anticorps monoclonal TG17-179. La détection a été faite avec des anticorps anti-IgG de souris, marqués à la peroxydase.

Le composant majeur de l'éluat est la protéine GP28.5. Le seul contaminant décelé est une protéine de 65 kDa. qui est également reconnue par l'anticorps TG17-179, et qui peut donc représenter soit un dimère de GP28.5, soit un antigène apparenté.

III) PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DE L'ANTIGENE GP28.5 ET DE

SES FRAGMENTS

EXEMPLE 4 : IMMUNISATION DES SOURIS ET ESSAIS DE PROTECTION.

Des souris femelles OF1 âgées de 8 à 10 semaines ont été immunisées de la façon suivante : quarante-deux, trente-cinq, vingt-sept et sept jours avant l'infection, les antigènes suivants :

- ESA correspondant à la sécrétion de 5.10^7 tachyzoïtes ; ou bien,
- 15 µg de GP28.5 purifiée par HPLC comme décrit à l'exemple 3 ont été mis en suspension dans 100 µl de PBS, émulsifié avec 100 µl d'adjuvant incomplet de FREUND et administrés par injection sous-cutanée.

Des souris témoin ont été traitées selon le même protocole par du PBS additionné de 100 µl d'adjuvant incomplet de FREUND.

Le jour de l'infection, les sérums ont été collectés, puis une suspension de 1200 kystes dans 0,3 ml de PBS, pH 7,2 a été administrée oralement.

Les sérums des souris immunisées avec les ESA ou la GP28.5 purifiée par HPLC ont été testés par transfert immuno-électrophorétique, contre des antigènes ESA de tachyzoïtes extraits au NP40, afin de déterminer s'ils reconnaissent l'antigène GP28.5.

Il apparaît que le profil d'immuno-réactivité est sensiblement le même que la révélation soit faite avec l'immunsérum de souris ou bien avec l'anticorps

monoclonal TG17-179 : dans les deux cas, trois bandes d'environ 100, 65 et 28 KDa sont révélées. Les deux bandes de poids moléculaire le plus élevé qui sont reconnues par l'anticorps TG17-179 représentent probablement des polymères de GP28.5

La figure 2 représente le pourcentage de souris survivantes après l'infection. Cette figure montre que, alors que seulement 25% des souris témoin immunisées uniquement avec l'adjuvant incomplet de FREUND survivent 15 jours après l'infection, 75% des souris immunisées avec l'antigène GP28.5 purifié par HPLC sont encore vivantes 50 jours après l'infection. Lorsque les souris sont immunisées avec les antigènes ESA, 45% survivent 50 jours après l'infection. Ces résultats montrent que l'immunisation avec l'antigène GP28.5 purifié par HPLC conduit à une protection significative.

EXEMPLE 5 : REACTIVITE DES SERUMS HUMAINS AVEC LES PROTEINES RECOMBINANTES ET RECONNAISSANCE DE L'EPITOPE C-TERMINAL

Les sérums humains ont été obtenus à partir de patients porteurs d'une infection chronique par *Toxoplasma gondii* (TG positif). Des sérums de patients sains ont été utilisés comme témoin (TG négatif). Le test a été réalisé par ELISA, et la révélation faite en utilisant des anticorps anti-IgG humaines biotinylées ; la fixation de ces anticorps a été décelée en utilisant des complexes streptavidine-biotine marqués à la peroxydase. Le substrat de peroxydase utilisé est l'OPD et la densité optique a été mesurée à 492 nm et exprimée par rapport à un témoin réalisé en utilisant comme antigène la GST, selon la formule suivante :

$$DO = \frac{DO \text{ du sérum réagissant avec la protéine recombinante de 59 acides aminés}}{DO \text{ du sérum réagissant avec la GST.}}$$

Dans ces conditions, la moyenne de la densité optique des sérums TG-négatifs était de 0,23. 74% des cinquante-neuf sérums TG-positifs étaient au dessus de cette densité

optique. La corrélation avec un test conventionnel des anticorps anti-TG est de : $R = 0,74$ P.

Malgré cette corrélation, des patients possédant de 50 à 100 UI/ml d'IgG anti-TG montrent des valeurs très dispersées de niveaux d'anticorps contre la protéine recombinante FM16 (les densités optiques s'échelonnent entre 0,35 et 1,5). Il semble donc qu'un niveau homogène d'anticorps anti-TG puisse en fait refléter des réponses variées à l'antigène GP28.5.

10 Dix sérums négatifs en ELISA contre la protéine contenant les cinquante-neuf acides aminés ont été testés en immunotransfert contre la protéine de fusion contenant les 212 acides aminés (clone LCDNA). Huit de ces sérums réagissent avec la protéine comprenant les 212
15 acides aminés, alors que 7 des sérums de contrôle réagissent négativement. Il est probable que ces 8 sérums reconnaissent des épitopes présents sur la protéine de 212 acides aminés, et plus proches de l'extrémité N-terminale que ceux portés par la protéine comprenant les
20 cinquante-neuf acides aminés.

La fixation de TG 17-179 à l'antigène recombinant FM16 a été testée en ELISA compétitif en présence de sérums de patients infectés ; le sérum a été ajouté à une dilution de 1/100 à la solution de l'anticorps mono-
25 clonal.

Ces essais de compétition entre TG 17-179 et des sérums de patients infectés montrent que les anticorps polyclonaux humains réagissent avec l'épitope C-terminal de la GP28.5 : parmi les 12 sérums humains
30 testés, 10 inhibent à des degrés variés la fixation de TG 17-179 à la protéine de fusion FM16.

La réactivité des protéines de fusion produites par les clones FM1 et FM3 avec l'anticorps TG 17-179 a également été testée ; FM1 et FM16 réagissent
35 beaucoup plus fortement avec l'anticorps TG 17-179 que le clone FM3.

Or, le séquençage de ces clones a révélé que le cadre de lecture en phase avec celui de la β -galactosidase, est de seulement 17 pb pour FM3, et 95 pb et 172 pb pour FM1 et FM16 respectivement. Il apparaît donc que le peptide codé par le clone FM3, et correspondant aux 5 amino acides C-terminaux de l'antigène GP28.5 est suffisant pour obtenir une réaction antigénique.

Cependant, dans la mesure où il est également apparu que la liaison de l'anticorps monoclonal TG 17-179 à ce peptide FM3 est plus faible que la liaison dudit anticorps aux peptides codés par les clones plus longs FM1 et FM16, les Inventeurs ont entrepris de déterminer la longueur optimale de l'épitope.

EXEMPLE 6 : IMMUNOREACTIVITE DE PEPTIDES SYNTHETIQUES CORRESPONDANT A L'EXTREMITÉ C-TERMINALE DE GP28.5

Des peptides se chevauchant et couvrant la séquence carboxy-terminale de GP28.5 (1 à 15 résidus) ont été synthétisés, en utilisant la méthode de MERRIFIELD.

Ils ont été testés par ELISA compétitif avec la protéine de fusion FM16.

Les quinze acides aminés terminaux de GP28.5 contiennent l'épitope réagissant avec l'anticorps monoclonal TG17-179. La capacité de ce peptide à inhiber la réactivité en ELISA contre la protéine recombinante contenant les cinquante-neuf acides aminés, de sérums obtenus à partir de patients atteints d'infections aiguës ou chroniques a été testée. Les deux types de sérums (aigu et chronique) sont inhibés, à un degré varié, par le peptide C-Terminal de quinze acides aminés. Pour les sérums chroniques, le pourcentage d'inhibition varie de 8 à 100% et on n'observe aucune corrélation avec la densité optique de départ. Le faible taux d'inhibition observé pour certains sérums peut être dû à la présence d'anticorps à faible affinité pour ce peptide. Toutefois, même en multipliant par dix la concentration du peptide, le

pourcentage d'inhibition n'est pas augmenté. La spécificité de l'inhibition a été démontrée en utilisant comme témoin un peptide de séquence différente et de longueur similaire. Le pourcentage d'inhibition des sérums aigus
5 varie de 15 à 90% et est également indépendant de la densité optique de départ.

Les études d'inhibition réalisées montrent donc que le peptide de 15 acides aminés comprend un
10 l'épitope majeur de la région C-Terminale de cinquante-neuf acides aminés, pour quatre sur douze des sérums obtenus à partir de patients chroniques, et pour trois sur douze des sérums obtenus à partir de patients atteints d'infections aiguës. En outre, trois sur douze des sérums chroniques, et quatre sur douze des sérums
15 aigus, montrent une inhibition partielle (35-80% d'inhibition).

Il apparaît donc que la réponse polyclonale à l'antigène GP28.5 implique une réactivité avec les quinze acides aminés C-Terminaux, réactivité dont le degré varie
20 suivant les individus. En revanche, le degré de cette réponse ne varie apparemment pas entre l'infection aiguë et l'infection chronique, aucune différence dans le pourcentage d'inhibition moyen pour chacun des deux groupes n'ayant été observée.

25 Toutefois, cinq sur douze des sérums chroniques et cinq sur douze des sérums aigus qui réagissent avec la région C-Terminale de cinquante-neuf acides aminés de GP28.5 ne réagissent pas avec le peptide de quinze acides aminés C-terminaux, ce qui montre que d'autres
30 épitopes B majeurs existent dans cette région de cinquante-neuf acides aminés et notamment dans le fragment correspondant aux amino-acides 127-176 de la séquence de l'antigène GP28.5.

Dans le cas de peptides C-terminaux présentant
35 moins de 15 acides aminés, les résultats sont les suivants :

L'inhibition la plus forte de la liaison de l'anticorps monoclonal TG 17-179 à la protéine de fusion est obtenue avec des peptides comprenant entre 11 et 15 résidus.

5 L'inhibition est toutefois obtenue avec l'octapeptide comprenant les 8 résidus C-terminaux.

La liaison de TG 17-179 à l'heptapeptide C-terminal est 8 fois moins importante que sa liaison à l'octapeptide. Enfin l'immunoréactivité du peptide syn-
10 thétique est perdue quand il comprend 6 acides aminés C-terminaux ou moins.

L'octapeptide dépourvu de sa fonction COOH et l'octapeptide comprenant deux résidus C-terminaux additionnels (Alanine) ont été également testés. Ces deux
15 peptides ont pratiquement la même activité que l'octapeptide C-terminal : ceci montre que la fonction carboxyle n'est pas nécessaire à l'immunoréactivité de l'épitope reconnu par TG 17-179.

Des mêmes peptides ont été testés en ELISA
20 direct. Dans ces conditions l'immunoréactivité en fonction de la longueur du peptide décroît plus rapidement : elle en effet perdue pour des peptides de longueur inférieure à 10 résidus. En conséquence, il apparaît qu'en ELISA direct, l'anticorps monoclonal nécessite un peptide
25 plus long que dans le test par inhibition. Dans ce cas particulier, il est peu probable que ceci soit dû à une mauvaise absorption des peptides les plus courts sur la plaque de microtitration, étant donné la nature hydrophobe des amino-acides desdits peptides.

30 Des peptides dépourvus de résidus C-terminaux ont également été synthétisés : alors que l'incubation de TG 17-179 avec l'octapeptide synthétique couvrant l'ensemble des résidus C-terminaux inhibe la liaison de la protéine de fusion recombinante, l'heptapeptide correspondant dépourvu du résidu glutamine carboxy-terminal
35 est 64 fois moins actif en tant que compétiteur, et

22

l'hexapeptide dépourvu des deux résidus carboxy-terminaux
est 104 fois moins actif.

LISTE DE SEQUENCES :
NOMBRE DE SEQUENCES: 2

1) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2152 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Toxoplasma gondii

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMENT: join(886..1035, 1275..1682)

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: exon
- (B) EMBLEMENT: 886..1035

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: exon
- (B) EMBLEMENT: 1275..1682

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: intron
- (B) EMBLEMENT: 1036..1274

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CTGCAGTCTT AATCATTTCC ACATAGTTTT TGTTCCTCCA GACAATCAAT CCTGGCTGAG	60
CCCCCATGT ACGCGTTACC ACCTGCCAGT GCATATGGGT TTGCATATTT TTGCTGAAGT	120
CCGAAAGAGG GGCCACGCAA AACGTTACCG GTTTGCTGCA GGCAGCCAGG TAGGTGGAAC	180
AGATCTCCAG CGAGTACGAC CACTGTGCGT GTACTTACGC CAAAAGGAAA ATACACCTGC	240
ACCGCTATTA AGCGGCAGTC GTCTACCTGA ATCGTCTCCC CGGCCTCATC ATTTTGTTCG	300
ACACAAGTTT CCATTAGGAC TTTGTGACAG TCGTCTGCTC TCGACCTTCC AACCGTCTCG	360
TGGACGAAAA ATCCTCGGGT GACTTGCCGT GGACGAACGC CTCCCGTTTG CTTCTACAAG	420
TGACTATGCG ATAGGTTCCG CAGTGCAGCC AGGCTTGCGA AAAACAAGTT CGTCGCAAAA	480
GGTTAATTAC CTACGCACCA CGAAGGAAAA CGCGTATCAC GTCAGTCCTT ACGGTCAATA	540
TACAAATACT TGGCCGTCCA GTGGAGGCAA CGTGCCCGTC GCACGGTGAT ACTGACTGGT	600

GACTTGCACG TACGTCTCTC GCCGGCGTCC AAACCAAATT GACCCGGGGC AGCCTACTCC	660
CTGTCTGTCCTT TAGGCTAAG TGCGAGCAAC ATCTCTACAC AGAGACGACG CCAGAGACGC	720
AAAATGAACA GCGGAACCTG CGTCGCTGTC TGTCTGCGA ACTGATGACA GAAAGGGTCA	780
TTAAACGATT TCTTTTGCAA TTCGCGCTGT TATCGCACGT TGTTTCTCTT CCCACGAATA	840
GTTGTTTTGA TTAGATATTG CTTCTTCTCC ACATATCGCC TCACA ATG TTC GCC Met Phe Ala	894
1	
GTA AAA CAT TGT TTG CTG GTT GTT GCC GTT GGC GCC CTG GTC AAC GTC Val Lys His Cys Leu Leu Val Val Ala Val Gly Ala Leu Val Asn Val	942
5 10 15	
TCG GTG AGG GCT GCC GAG TTT TCC GGA GTT GTT AAC CAG GGA CCA GTC Ser Val Arg Ala Ala Glu Phe Ser Gly Val Val Asn Gln Gly Pro Val	990
20 25 30 35	
GAC GTG CCT TTC AGC GGT AAA CCT CTT GAT GAG AGA GCA GTT GGG Asp Val Pro Phe Ser Gly Lys Pro Leu Asp Glu Arg Ala Val Gly	1035
40 45 50	
TAAGTTGGCA AAAGTAATGA TAGAGGCAGG GGTGAACGA TAGGCGGCTG CAGATTTGTA	1095
TAACACAACA TGATGTAGCT GCCACGGTTT TTTTTCGGAG AGTGATGCCG TCTGACTGTC	1155
ATCGCACCCA TGGGAGCTAG GGAGGTGCGC TTCTGTGTGA TATGTATTGT CCTAGTCCAA	1215
TTTCCCACGC ACTGTAGTGT CTTGAGACTC GGTGCCATGT AGAATTTTGT GTCTGCAGA	1274
GGA AAA GGT GAA CAT ACA CCA CCA CTC CCA GAC GAG AGG CAA CAA GAG Gly Lys Gly Glu His Thr Pro Pro Leu Pro Asp Glu Arg Gln Gln Glu	1322
55 60 65	
CCA GAA GAA CCG GTT TCC CAA CGT GCA TCC AGA GTG GCA GAA CAA CTG Pro Glu Glu Pro Val Ser Gln Arg Ala Ser Arg Val Ala Glu Gln Leu	1370
70 75 80	
TTT CGC AAG TTC TTG AAG TTC GCT GAA AAC GTC GGA CAT CAC AGT GAG Phe Arg Lys Phe Leu Lys Phe Ala Glu Asn Val Gly His His Ser Glu	1418
85 90 95	
AAG GCC TTC AAA AAA GCA AAG GTG GTG GCA GAA AAA GGC TTC ACC GCG Lys Ala Phe Lys Lys Ala Lys Val Val Ala Glu Lys Gly Phe Thr Ala	1466
100 105 110	
GCA AAA ACG CAC ACG GTT AGG GGT TTC AAG GTG GCC AAA GAA GCA GCT Ala Lys Thr His Thr Val Arg Gly Phe Lys Val Ala Lys Glu Ala Ala	1514
115 120 125 130	

25

GGA AGG GGC ATG GTG ACC GTT GGC AAG AAA CTC GCG AAT GTG GAG AGT	1562
Gly Arg Gly Met Val Thr Val Gly Lys Lys Leu Ala Asn Val Glu Ser	
135 140 145	
GAC AGA AGC ACT ACG ACA ACG CAG GCC CCC GAC AGC CCT AAT GCC CTG	1610
Asp Arg Ser Thr Thr Thr Thr Gln Ala Pro Asp Ser Pro Asn Gly Leu	
150 155 160	
GCA GAA ACC GAG GTT CCA GTG GAG CCC CAA CAG CGG GCC GCA CAC GTG	1658
Ala Glu Thr Glu Val Pro Val Glu Pro Gln Gln Arg Ala Ala His Val	
165 170 175	
CCC GTC CCA GAC TTT TCG CAG TAATGTTGAC TACGACGAAA GTGATGCGCA	1709
Pro Val Pro Asp Phe Ser Gln	
180 185	
GGCTGGAAAG CCGCTGAAGG GAGAAGTCTA CAAAGCCGAT CAGTGAAAAA TGTGTGGGGA	1769
GGTGCTCTTG TTGCAGGAAT GCAATGTGTT AAGCATCGTG TTCGAATGCA GTGCGTGTAT	1829
CAGTTGTGCG CGGAAGGACA CTGCTTCAAT GTTAAGAACC TGTTTTCTCC GTAGAGAGGA	1889
CCAAAAGACG ATTGCAAAAC TGGTATGTAC GCAATAGCCC AATGCCGGAC GTCAGTTGGT	1949
TGTATGTGAC GCTCCCAGAT GTCATATGCC TTGTGAGTGT GTCTGGGATG CAAGTTTTTG	2009
GTGTGCGTTG ATTTGCCAG CTTATGACAG TGGCAGACGA ATTATTGACA TGATACAAGG	2069
ACGCAGAAAG GAACAAACAC CGTAGTTCCA GTCGACACAG AAAGGGAGGG TAAAGAAAGT	2129
AATTGAAAGG TGATTTTAGA TAA	2152

26

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 185 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Phe Ala Val Lys His Cys Leu Leu Val Val Ala Val Gly Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Asn Val Ser Val Arg Ala Ala Glu Phe Ser Gly Val Val Asn Gln
 20 25 30
 Gly Pro Val Asp Val Pro Phe Ser Gly Lys Pro Leu Asp Glu Arg Ala
 35 40 45
 Val Gly Gly Lys Gly Glu His Thr Pro Pro Leu Pro Asp Glu Arg Gln
 50 55 60
 Gln Glu Pro Glu Glu Pro Val Ser Gln Arg Ala Ser Arg Val Ala Glu
 65 70 75 80
 Gln Leu Phe Arg Lys Phe Leu Lys Phe Ala Glu Asn Val Gly His His
 85 90 95
 Ser Glu Lys Ala Phe Lys Lys Ala Lys Val Val Ala Glu Lys Gly Phe
 100 105 110
 Thr Ala Ala Lys Thr His Thr Val Arg Gly Phe Lys Val Ala Lys Glu
 115 120 125
 Ala Ala Gly Arg Gly Met Val Thr Val Gly Lys Lys Leu Ala Asn Val
 130 135 140
 Glu Ser Asp Arg Ser Thr Thr Thr Thr Gln Ala Pro Asp Ser Pro Asn
 145 150 155 160
 Gly Leu Ala Glu Thr Glu Val Pro Val Glu Pro Gln Gln Arg Ala Ala
 165 170 175
 His Val Pro Val Pro Asp Phe Ser Gln
 180 185

REVENDEICATIONS

1) Fragment d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence codant pour l'antigène GP28.5 de toxoplasme.

5 2) Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence représentée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ.ID. NO:1.

10 3) Fragment d'acide nucléique codant pour un polypeptide comprenant au moins un épitope de l'antigène GP28.5 de toxoplasme, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué par :

- un fragment d'acide nucléique codant pour un polypeptide comprenant au moins les 5 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ.ID.NO:2 ;

15

- un fragment d'acide nucléique codant pour un polypeptide comprenant les amino acides 24-129 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

- un fragment d'acide nucléique codant pour un polypeptide comprenant les amino acides 127-176 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

20

4) Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment d'acide nucléique selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3.

25 5) Cellule eucaryote ou procaryote transformée, caractérisée en ce qu'elles contient au moins un vecteur recombinant selon la Revendication 4.

6) Polypeptide caractérisé en ce que sa séquence est celle représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ.ID.NO:2.

30

7) Protéine recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie de la séquence SEQ.ID.NO:2, éventuellement fusionnée avec une autre séquence polypeptidique.

8) Protéine recombinante selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par :

- une protéine recombinante comprenant les amino-acides 127-176 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

- une protéine recombinante comprenant les amino-acides 1-129 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

- une protéine recombinante comprenant les amino-acides 24-129 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

9) Procédé de production d'une protéine recombinante selon la Revendication 8, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on procède à la mise en culture d'une cellule transformée selon la Revendication 6.

10) Fragment peptidique constituant un épitope de l'antigène GP28.5 de toxoplasme, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué par :

- un fragment peptidique comprenant au moins les 5 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ.ID.NO:2 ;

- un fragment peptidique comprenant entre 5 et 15 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ.ID.NO:2 ;

- un fragment peptidique comprenant les acides aminés 24 à 129 de la séquence SEQ.ID.NO:2 ;

- un fragment peptidique comprenant au moins les acides aminés 55 à 70 de la séquence SEQ.ID.NO:2 ;

- un fragment peptidique comprenant les acides aminés 140 à 160 de la séquence SEQ.ID.NO:2.

11) Fragment peptidique selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend entre 8 et 15 acides aminés C-terminaux de la séquence SEQ.ID.NO:2.

12) Compositions antigéniques caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un antigène pris dans le groupe constitué par :

- un polypeptide de séquence SEQ.ID.NO:2 ;

- un fragment peptidique selon une quelconque des revendications 10 ou 11 ;

- une protéine recombinante selon la revendication 8.

5 13) Procédé de préparation d'anticorps anti-GP28.5, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on immunise un animal avec une composition antigénique selon la revendication 12.

10 14) Utilisation de compositions antigéniques selon la revendication 12 pour l'obtention de réactifs de diagnostic de la toxoplasmose.

 15) Utilisation de compositions antigéniques selon la revendication 12 pour l'obtention de vaccins anti-toxoplasmes.

1/3

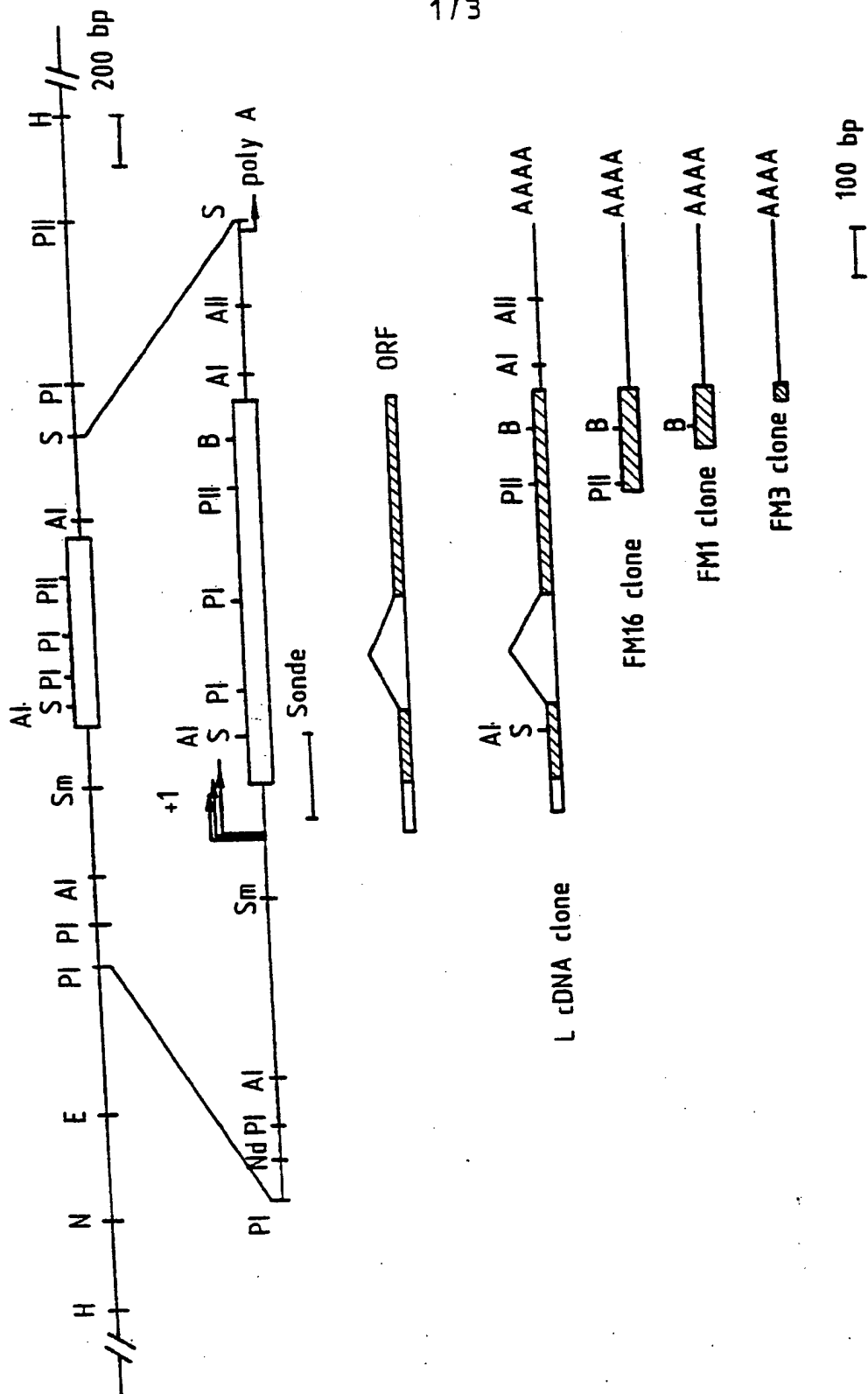
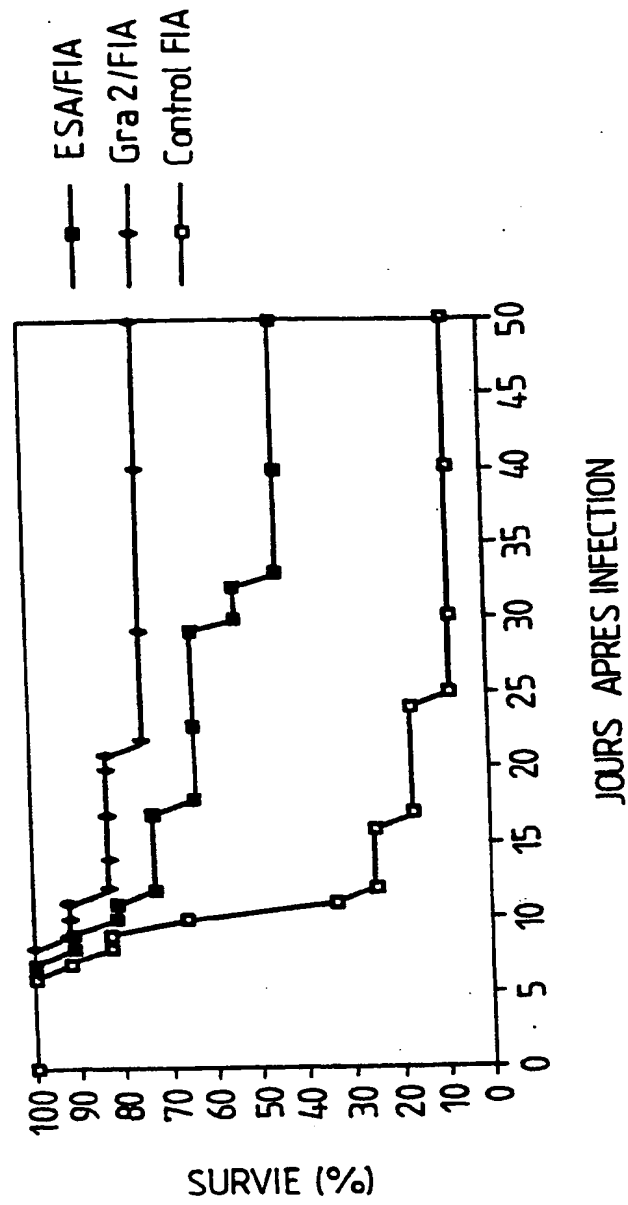
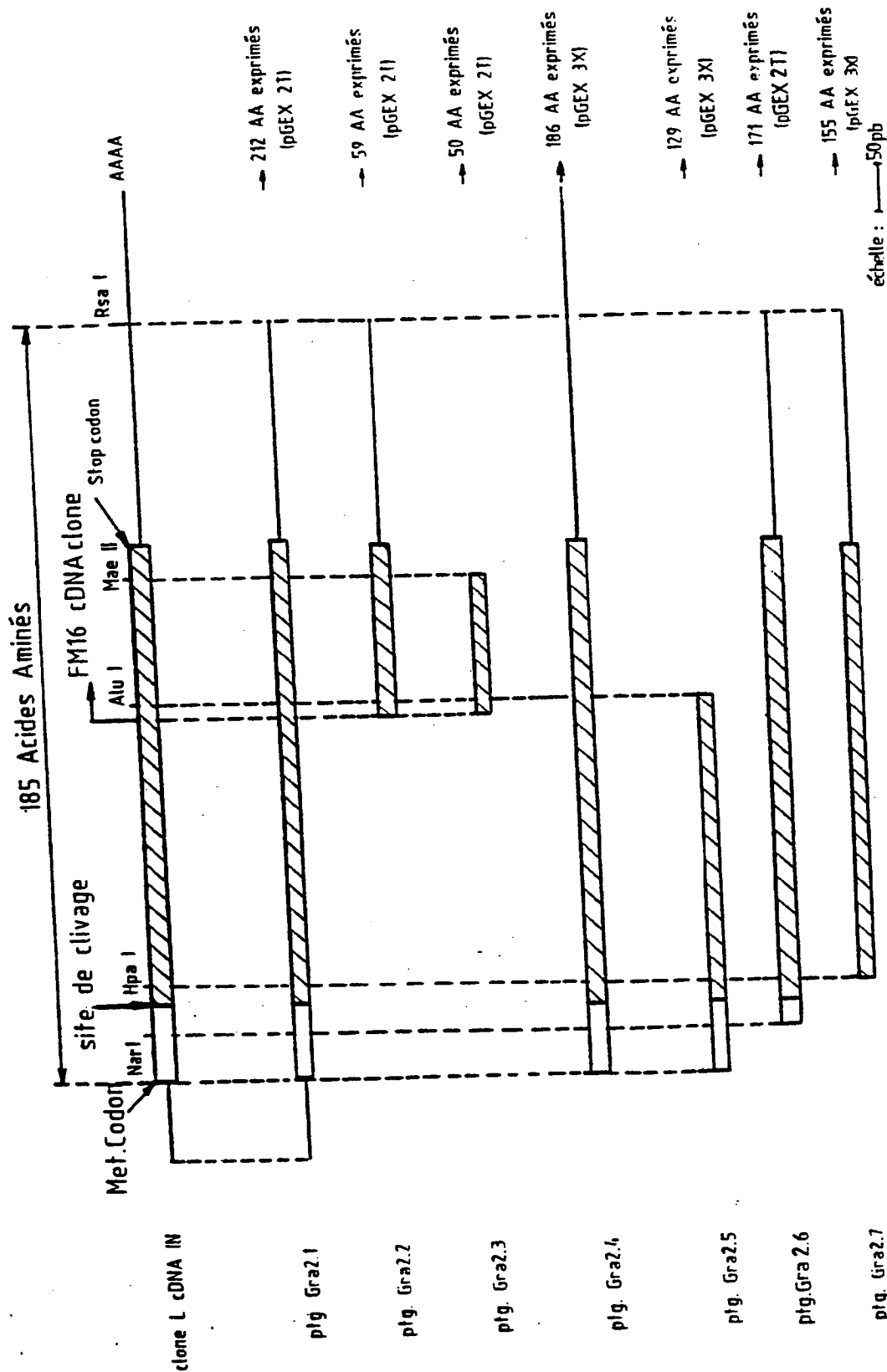


FIG.1

2 / 3

FIG. 2

3/3



CONSTRUCTIONS dans pGEX

FIG. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00575

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁵ : C12N 15/30; C12N 1/21; C12P 21/02; C07K 13/00
 C12N 15/62; G01N 33/566; A61K 39/002; C12N 5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁵ : C07K; C12N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY Vol. 34, 1989, pages 3 - 14 J. B. PRINCE ET AL "Cloning of cDNAs encoding a 28 kilodalton antigen of Toxoplasma gondii" (cited in the application) see the whole document	1-15
X	PARASITOLOGY Vol. 103, No. 3, 1991, LONDON pages 321 - 329 A. ACHBAROU ET AL "Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of Toxoplasma gondii" *the whole document, in particular the conclusion*	6,12-13
X	EXPERIMENTAL PARASITOLOGY Vol. 71, 1990, pages 114 - 124 H. CHARIF ET AL "Toxoplasma gondii : ./.	6-8, 12-14-16, 24-26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 August 1993 (30.08.93)

Date of mailing of the international search report

20 September 1993 (20.09.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR93/00575

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites" (cited in the application) see the whole document ---</p> <p>JOURNAL OF CELL BIOLOGY Vol. 115, 1991, page 5A L. D. SIBLEY ET AL "Calcium regulated secretion and modification of host-cell endocytic compartments by Toxoplasma" *abstract 22*</p>	1-2,6-9, 12
X	<p>---</p> <p>PARASITOLOGY RESEARCH Vol. 76, 1990, pages 473 - 478 F. DARCY ET AL "Identification and biochemical characterization of antigens of tachyzoites and bradyzoites of Toxoplasma gondii with cross-reactive epitopes" (cited in the application) see the whole document ---</p>	6,12-15
A	<p>---</p> <p>MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY Vol. 45, 1991, pages 249 - 260 M.A. LERICHE ET AL "Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of Toxoplasma gondii tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies" ---</p>	
A	<p>---</p> <p>INFECTION AND IMMUNITY. Vol. 55, No. 9, September 1987, WASHINGTON US pages 2137 - 2141 L. D. SIBLEY ET AL "Ultrastructural localization of an intracellular Toxoplasma protein that induces protection in mice" (cited in the application) see the whole document -----</p>	6,12-15

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00575

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N15/30; C12N15/62;	C12N1/21; G01N33/566;	C12P21/02; A61K39/002; C07K13/00 C12N5/10
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C07K ; C12N ; A61K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY vol. 34, 1989, pages 3 - 14 J. B. PRINCE ET AL 'Cloning of cDNAs encoding a 28 kilodalton antigen of Toxoplasma gondii' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-15
X	PARASITOLOGY vol. 103, no. 3, 1991, LONDON pages 321 - 329 A. ACHBAROU ET AL 'Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of Toxoplasma gondii' * le document en entier, plus particulièrement la conclusion * --- -/-	6, 12-13
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>Catégories spéciales de documents cités ¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
30 AOUT 1993	23.03.93	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	LE CORNEC N.D.R.	

Formulaire PCT/ISA/210 (dernière édition) (Janvier 1985)

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴			(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ^o	Identification des documents cités, ¹⁵ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸	
X	EXPERIMENTAL PARASITOLOGY vol. 71, 1990, pages 114 - 124 H. CHARIF ET AL 'Toxoplasma gondii : Characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites' cité dans la demande voir le document en entier ----	6-8, 12-14-16 ,24-26	
X	JOURNAL OF CELL BIOLOGY vol. 115, 1991, page 5A L. D. SIBLEY ET AL 'Calcium regulated secretion and modification of host-cell endocytic compartments by Toxoplasma' * abstract 22 *	1-2,6-9, 12	
X	PARASITOLOGY RESEARCH vol. 76, 1990, pages 473 - 478 F. DARCY ET AL 'Identification and biochemical characterization of antigens of tachyzoites and bradyzoites of Toxoplasma gondii with cross-reactive epitopes' cité dans la demande voir le document en entier ----	6,12-15	
A	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY vol. 45, 1991, pages 249 - 260 M.A. LERICHE ET AL 'Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of Toxoplasma gondii tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies' ----		
A	INFECTION AND IMMUNITY. vol. 55, no. 9, Septembre 1987, WASHINGTON US pages 2137 - 2141 L. D. SIBLEY ET AL 'Ultrastructural localization of an intracellular Toxoplasma protein that induces protection in mice' cité dans la demande voir le document en entier -----	6,12-15	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)